植 物 分 类 与 资 源 学 报　2013，35（3）：375～385
Plant Diversity and Resources　DOI：10.7677/ynzwyj201313083

结合叶绿体和核 DNA 序列变异可提高云杉属物种的分子鉴别率*

邹嘉宾，王　茜，李丽丽，刘建全**
（兰州大学生命科学学院草地农业系统国家重点实验室，甘肃 兰州　730000）

摘要：松科（Pinaceae）云杉属（*Picea*）植物是北半球广泛分布的重要森林树种，由于频繁的种间杂交渐渗及近期的辐射分化导致种间形态趋同，传统的形态学方法很难准确鉴定该属物种。近期兴起和发展的 DNA 条形码技术为云杉属物种的划分和鉴定提供了可参考的方法。在云杉属青藏高原种质资源收集过程完成后，选取 5 个叶绿体 DNA 片段（*mat*K，*rbc*L，*trn*H-*psb*A，*trn*L-*trn*F 和 *trn*S-*trn*G）以及 3 个核 DNA 片段（*4CL*，*Sb29* 和 *GI*），利用 PWG-distance 和 Tree-Building 两种方法对青藏高原以及中国其他地区分布的 19 个云杉属物种 83 个个体进行了物种鉴别分辨率的评价。研究结果显示单个的叶绿体 DNA 片段（10.5%～26.3%）和核 DNA 片段（15.8%～26.3%）对云杉属物种鉴别的分辨率较低，组合的叶绿体 DNA 片段的分辨能力（15.8%～42.1%）虽然高于单个 DNA 片段，但分辨率最高的 *trn*H-*psb*A+*trn*S-*trn*G 和 *trn*S-*trn*G+*trn*L-*trn*F 两个组合也只能达到42.1%；组合的核 DNA 片段（26.3%～36.8%）一样对云杉属物种鉴别存在困难。但是叶绿体 DNA 片段和核 DNA 片段的组合可以明显提高对云杉属物种鉴定的分辨率，尤其是 *trn*S-*trn*G+*trn*L-*trn*F+*4Cl* 的组合片段，其分辨率可达到57.9%。因此在将来利用 DNA 条形码鉴别物种时，在常规 DNA 条形码片段不起作用的情况下，可采用这种叶绿体 DNA 片段和核 DNA 片段组合的方法来鉴定和区分植物物种。

关键词：云杉属；DNA 条形码；核 DNA 片段；物种鉴别
中图分类号：Q 949；Q 75　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2095-0845(2013)03-375-11

The Combination of Chloroplast and Nuclear DNA Fragments Could Improve the Discrimination Power for Barcoding Spruce（*Picea*）Species

ZOU Jia-Bin，WANG Xi，LI Li-Li，LIU Jian-Quan**
（*State Key Laboratory of Grassland Agro-Ecosystem*，*College of Life Sciences*，*Lanzhou University*，Lanzhou 730000，China）

Abstract：Spruces（*Picea*），a genus of Pinaceae，are important components of the forests in the Northern Hemisphere. It is relatively difficult to distinguish species by using traditional morphological method due to frequent interspecific hybridization and introgression，and radiative diversification. However，the emerging and developing of the DNA barcoding methods provide an alternative approach. In this study，we tested the discrimination powers between five chloroplast DNA regions（*mat*K，*rbc*L，*trn*H-*psb*A，*trn*L-*trn*F and *trn*S-*trn*G），three nuclear DNA regions（*4CL*，*Sb29* and *GI*）and the combination of these fragments in spruces. We sampled 83 trees，which represent 19 spruce species mainly from Qinghai-Tibetan Plateau and also from other regions of China. We used two methods，PWG-distance and Tree-Building，to conduct barcoding analsyes. A single chloroplast DNA fragment（10.5%－26.3%）or a single nuclear DNA fragment（15.8%－26.3%）always shows low level of species discrimination rate. Although the combination of the chloroplast DNA fragments had higher discrimination rate than the single one，

* 基金项目：科技部科技基础性工作专项重点项目（2007FY110100）和国家自然科学基金项目（30930072）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：liujq@nwipb.ac.cn
收稿日期：2013-04-09，2013-04-12 接受发表
作者简介：邹嘉宾（1987-）男，博士，主要从事群体遗传学研究。

the highest rate of discrimination was only 42.1% for both combinations of *trn*H-*psb*A+*trn*S-*trn*G and *trn*S-*trn*G+*trn*L-*trn*F. And the combination of the nuclear DNA fragments also showed lower rates of discrimination (26.3%–36.8%). It thus appears that it is difficult to discriminate spruce species using only chloroplast DNA fragments or nuclear DNA regions. However, the combination of chloroplast and nuclear DNA regions had higher resolution for identifying spruce species, especially for *trn*S-*trn*G+*trn*L-*trn*F+*4Cl*, whose discrimination rate can reach up to 57.9%. Therefore, in the future, this combination of fragments from chloroplast and nuclear can be widely adopted for the discrimination of plant species when the normal DNA barcodes fail to work.

Key words: *Picea*; DNA barcoding; Nuclear DNA fragments; Discrimination

云杉属（*Picea*）是松科（Pinaceae）第三大属，按照目前广为接受的Farjón（2001）对云杉属的分类，全世界约有34个种，其中亚洲分布有24个种。云杉属是广泛分布于北半球的重要森林树种，具有非常重要的生态及经济价值。中国境内云杉属分布有17个种，包括云杉（*Picea asperata*），青海云杉（*P. crassifolia*），红皮云杉（*P. koraiensis*），白扦（*P. meyeri*），新疆云杉（*P. obovata*），鳞皮云杉（*P. retroflexa*），紫果云杉（*P. purpurea*），青扦（*P. wilsonii*），大果青扦（*P. neoveitchii*），台湾云杉（*P. morrisonicola*），鱼鳞云杉（*P. jezoensis*），麦吊云杉（*P. brachytyla*），缅甸云杉（*P. farreri*），丽江云杉（*P. likiangensis*），长叶云杉（*P. smithiana*），雪岭云杉（*P. schrenkiana*）和西藏云杉（*P. spinulosa*）；其中丽江云杉（*P. likiangensis*）可根据形态差异细分为5个变种，其中3个变种（var. *likiangesis*，var. *rubescens* 和 var. *linzhiensis*）有明显不同的形态特征且广泛分布于西藏东部，四川西部及云南西北部地区；麦吊云杉（*P. brachytyla*）可以根据形态差异被细分为 var. *brachytyla* 和 var. *complanata* 两个变种（Fu 等，1999）。上述云杉属植物种的划分都是基于传统的形态学分类方法，如针叶形态，气孔线的条数及球果大小等。但由于云杉属植物辐射分化、具有大的有效群体、长的世代时间和风媒传粉的特征，导致物种间杂交频繁，形态趋同严重，物种鉴别存在较大困难（Li 等，2010；Du 等，2011；Zou 等，2012）。但是，准确鉴别云杉属物种，在理论和实践上都具有重要意义。

近年来兴起和发展的DNA条形码技术为解决云杉属内物种的划分和鉴定提供了可参考的方法。Hebert 等（2003）正式提出将DNA条形码用于分类学研究，即利用一个或多个DNA片段通过系统发育和聚类分析来实现对物种快速准确的鉴定。这种方法一经提出便得到广泛应用。多个研究发现利用线粒体 *CO1* 基因（cytochrome c oxidase subunit 1 gene，细胞色素氧化酶亚基1基因）作为DNA条形码可以高效地识别动物物种，例如两栖类（Vences 等，2005；Smith 等，2008），鸟类（Hebert 等，2004；Kerr 等，2007）和鱼类（Ward 等，2005，2009）。但是，由于在植物中线粒体基因的突变速率较低（Cho 等，2004）且存在频繁的结构重排现象（Palmer 和 Herbon，1988），使得 *CO1* 这样的线粒体基因不能成为普遍通用的植物DNA条形码（Fazekas 等，2008）。因此，现在多选择进化速率较快的叶绿体基因片段和核基因组的核糖体DNA转录间隔区（ITS）作为鉴别植物物种的DNA条形码（Kress 等，2005；Cowan 等，2006；Pennisi 等，2007；CBOL Plant Working Group，2009；Li 等，2011；Hollingsworth，2011）。在综合考虑了通用性，序列质量和物种鉴定水平等方面的因素后，生命条形码联盟植物工作组（CBOL Plant Working Group，2009）建议使用 *mat*K+*rbc*L 的组合片段作为鉴定陆地植物的核心DNA条形码，并建议将叶绿体基因 *trn*H-*psb*A 片段和核ITS片段作为补充的DNA条形码（Hollingsworth 等，2011）。

尽管上述叶绿体DNA片段和核ITS片段在多数被子植物属中具有较高的物种鉴别率（Fazekas 等，2008；Li 等，2011），但这些片段对裸子植物的物种鉴别率非常低，不足以对物种进行准确的鉴定（Ran 等，2010；Hollingsworth 等，2011）。ITS片段只在裸子植物中长度变异大，在部分属内致同进化还不完全（Kan 等，2007），且序列扩增困难，使其不能在裸子植物中作为通用的DNA条形码。Ran 等（2010）利用7个叶绿体DNA片段对云杉属的DNA条形码研究发

现，由于种间的不完全谱系筛选，近期辐射分化，以及频繁的种间渐渗，无论是单个片段还是多个组合片段都不能有效的分辨中国分布的云杉属物种。因此，他们建议除了利用单亲遗传的叶绿体 DNA 片段，还应选取合适的核 DNA 片段作为鉴定云杉属植物的 DNA 补充条形码。

为验证这一可能性，本研究在我们长期采集青藏高原云杉属种质资源基础上，收集了中国其他地区分布的云杉属物种，进行系统的比较研究。共收集中国云杉属的所有 19 个种，包括丽江云杉 3 个变种和麦吊云杉 2 个变种。对于每个物种，均采用 Li 等（2011）的建议，至少采集 2 个样本。我们研究了 3 个常用的叶绿体 DNA 条形码片段（*mat*K，*rbc*L 和 *trn*H-*psb*A）、2 个候选的叶绿体 DNA 片段（*trn*L-*trn*F 和 *trn*S-*trn*G）以及 3 个核 DNA 片段（*4CL*，*Sb29* 和 *GI*）；通过构建系统树和聚类分析对这些片度及其组合对中国云杉属物种的分子鉴别率进行评估，并尝试筛选出适合用于该属物种鉴别的 DNA 条形码片段或片段组合，为将来该属植物的鉴定及分类提供参考依据。

1　材料和方法

1.1　研究材料

本研究选取了云杉属 19 个物种的 83 个个体作为研究材料，每个物种包括 2 ~ 5 个个体，详细材料信息见表 1。所选实验材料均为野外采集的针叶，采集后经硅胶快速干燥以备 DNA 的提取。凭证标本存兰州大学生命科学学院（LZU）。

1.2　DNA 提取，聚合酶链式反应（PCR）及测序

采用 CTAB 法（Doyle 和 Doyle，1987）从大约 20 mg 经硅胶干燥的针叶里提取全基因组 DNA，溶解于 TE 溶液中的 DNA 终浓度为 50 ng · μL^{-1}。PCR 扩增反应在 ABI 9700 型 PCR 仪上进行，PCR 反应体系（25 μL）：DNA 模板 10 ~ 40 ng；50 mM Tris-HCl，1.5 mM $MgCl_2$，0.5 mM dNTPs，以及各 2 μM 的正反引物，0.75 单位的 *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，合格产物纯化后在 ABI3130 xl Genetic Analyzer（Applied Biosystems，Foster City，CA，USA）型测序仪上进行测序。本研究中所有 DNA 片段使用的 PCR 扩增和测序的引物相同，详细信息见表 2。为了保证序列的准确性，经过重复测序排查了序列中的单碱基突变。所有序列用 MEGA 4.0（Kumar 等，2008）进行拼接，然后利用 Clustal X（Thompson 等，1997）进行序列的比对和人工校正。

表 1　采样信息表

Table 1　Samples for testing potential barcodes

种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher
雪岭云杉	新疆后峡 Houxia，Xinjiang	108050811	白扦 *P. meyeri*	山西忻州 Xinzhou，Shanxi	2004015
Picea schrenkiana	新疆昭苏 Zhaosu，Xinjiang	1115050815	Rehder et Wilson	山西涿鹿 Zhuolu，Shanxi	liu05229
Fischer et Meyer	新疆伊犁 Yili，Xinjiang	1115050813		内蒙古蓝旗 Lanqi，Neimenggu	liu05156
	新疆奇台 Qitai，Xinjiang	8520050810		山西关帝山 Guandishan Shanxi	BQ1
	新疆巩留 Gongliu，Xinjiang	120050817	鱼鳞云杉 *P. jezoensis*	吉林白山 Baishan，Jilin	liu05187
新疆云杉	哈萨克斯坦 Kazakhstan	050530	（Sieb. et Zucc.）Carrière	黑龙江伊春 Yichun，Heilongjiang	ZXZ08038
P. obovata Ledeb.	哈萨克斯坦 Kazakhstan	050620		吉林长白山 Changbaishan，Jilin	ZR09034
	新疆富蕴 Fuyun，Xinjiang	2005068		吉林安图 Antu，Jilin	ZR09048
	新疆布尔津 Buerjing，Xinjiang	200505	青海云杉	甘肃永登 Yongdeng，Gansu	1464
	新疆阿勒泰 Aletai，Xinjiang	2005055	*P. crassifolia* Komarov	青海大同 Datong，Qinghai	1329
白扦 *P. meyeri*	山西五台 Wutai，Shanxi	2004013		宁夏贺兰山 Heilanshang，Ningxia	HLS
Rehder et Wilson					

（continued）

续表 1 Table 1 continued

种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher	种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher
青海云杉	青海肃南 Sunan, Qinghai	1511		四川若尔盖 Ruoergai, Sichuan	142
P. crassifolia Komarov	青海同德 Tongde, Qinghai	1702	大果青扦	陕西太白 Taibai, Shaanxi	DG1
川西云杉 *P. likiangensis*	四川德格 Dege, Sichuan	Ljq07313	*P. neoveitchii* Masters	河南内乡 Neixiang, Henan	DG2
(Franch.) Pritzel var.	青海囊谦 Nangqian, Qinghai	1026		陕西秦岭 Qinling, Shaanxi	RY2009
rubescens Rehder et Wilson	西藏类乌齐 Leiwuqi, Xizang	Ljq07326		甘肃舟曲 Zhouqu, Gansu	LiuJQ-09xz-lzt-111
	西藏江达 Jiangda, Xizang	Ljq07308	油麦吊云杉 *P. brachytyla*	四川木里 Muli, Sichuan	TB09021
	青海玉树 Yushu, Qinghai	Ljq07318	(Franch.) Pritzel var.	云南贡山 Gongshan, Yunnan	TB09007
紫果云杉	四川若尔盖 Ruoergai, Sichuan	Q2	*complanata* (Masters)	云南兰坪 Lanping, Yunnan	TB09012
P. purpurea Masters	四川松潘 Songpan, Sichuan	2719	Cheng ex Rehder	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	WYJ09920
	青海同仁 Tongren, Qinghai	073		云南德钦 Deqin, Yunnan	WYJ09931
	四川若尔盖 Ruoergai, Sichuan	Liu0610061	麦吊云杉 *P. brachytyla*	甘肃舟曲 Zhouqu, Gansu	LiuJQ-09xz-lzt-116
	甘肃卓尼 Zhuoni, Gansu	Z-0610183	(Franch.) Pritzel var.	甘肃文县 Wenxian, Gansu	LiuJQ-09xz-lzt-198
林芝云杉 *P. likiangensis*	西藏墨脱 Motuo, Xizang	2656	*brachytyla*	四川乐山 Leshan, Sichuan	TB09025
(Franch.) Pritzel var.	西藏林芝 Linzhi, Xizang	2634		四川天全 Tianquan, Sichuan	TB09027
linzhiensis Cheng et Fu	西藏林芝 Linzhi, Xizang	2601		四川青川 Qingchuan, Sichuan	TB09035
	西藏波密 Bomi, Xizang	Ljq07290	红皮云杉	黑龙江黑河 Heihe, Heilongjiang	ZXZ08025
	西藏林芝 Linzhi, Xizang	2613	*P. koraiensis* Nakai	黑龙江伊春 Yichun, Heilongjiang	ZXZ08032
云杉	甘肃卓尼 Zhuoni, Gansu	LiuJQ-09xz-lzt-119		黑龙江伊春 Yichun, Heilongjiang	ZXZ08039
P. asperata Masters	四川若尔盖 Ruoergai, Sichuan	LiuJQ-09xz-lzt-140		黑龙江宁安 Ningan, Heilongjiang	ZXZ08045
	四川理县 Lixian, Sichuan	LiuJQ-09xz-lzt-175		黑龙江安图 Antu, Heilongjiang	ZXZ08057
	四川阿坝 Aba, Sichuan	LiuJQ-09xz-lzt-147	长叶云杉 *P. smithiana*	西藏吉隆 Jilong, Xizang	Ljq07136
	四川若尔盖 Ruoergai, Sichuan	LiuJQ-09xz-lzt-141	(Wallich) Boiss.	尼泊尔 Nepal	20816056
丽江云杉 *P. likiangensis*	四川木里 Muli, Sichuan	L16		西藏惠东 Huidong, Xizang	CY2
(Franch.) Pritzel var.	云南中甸 Zhongdian, Yunnan	L21	西藏云杉 *P. spinulosa*	西藏亚东 Yadong, Xizang	Ljq07155-1
likiangensis	云南丽江 Lijiang, Yunnan	L19	(Griff.) Henry	西藏亚东 Yadong, Xizang	Ljq07155-2
	云南丽江 Lijiang, Yunnan	L20		西藏亚东 Yadong, Xizang	Ljq07155-3
	四川乡城 Xiangcheng, Yunnan	L24	缅甸云杉 *P. farreri*	云南泸水 Lushui, Yunann	TB09010
青扦	青海互助 Huzhu, Qinghai	1306	C. N. Page et Rushforth	云南泸水 Lushui, Yunann	TB09010
P. wilsonii Masters	陕西凤县 Fengxian, Shaanxi	QQ5	台湾云杉	中国台湾 Taiwan, China	Liujq2010-Picea-2010-8-1
	陕西宁陕 Ningshan, Shaanxi	QQ3	*P. morrisonicola* Hayata	中国台湾 Taiwan, China	Liujq2010-Picea-2010-8-2
	重庆城口 Chengkou, Chongqing	QQ7			

表 2　用于“条形码分类”的 8 个片段的引物信息表

Table 2　Primer pairs used for amplification and sequencing for DNA barcoding

片段 Region	引物 Primers	序列 Sequences（5’-3’）	来源 Reference
*mat*K	matK F	GAACTCGTCGGATGGAGTG	This study
	matK R	TAAACGATCCTCTCATTCACGA	This study
*rbc*L	rbcL 1F	ATGTCACCACAAACAGAAAC	Ivanova 等，2008
	724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	Ivanova 等，2008
*trn*H-*psb*A	trnH2	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	Tate 和 Simpson，2003
	psbAF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang 等，1997
*trn*L-*trn*F	trnL	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet 等，1991
	trnF	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taberlet 等，1991
*trn*S-*trn*G	trnS	GCCGCTTTAGTCCACTCAGC	Hamilton，1999
	trnG	GAACGAATCACACTTTTACCAC	Hamilton，1999
4CL	MontF	GCCAATCCTTTTTACAAGC	Syring 等，2005
	4clRStrob	CTGCTTCTGTCATGCCGTA	Syring 等，2005
Sb29	Sb29 F	AGCGGCATTGAACAGAGTAAC	Perry 和 Bousquet，1998
	Sb29 R	AATGGAAATGAAGGCAGACTC	Perry 和 Bousquet，1998
GI	GI560U	CAGGCAAGGCAATGGCAGAAGGGC	Heuertz 等，2006
	GI2235L	ATACAAGTCCCGCATGGCTGTTAT	Heuertz 等，2006

1.3　数据分析

利用 DnaSP 5.0 软件（Librado 和 Rozas，2009）统计了每个片段的插入缺失（indels）和单核苷酸多态性（SNPs）。本研究将 8 个 DNA 片段单独构建矩阵，从 5 个叶绿体 DNA 片段选取其中 2 个、3 个、4 个或全部片段组合并且将 3 个核 DNA 片段两两组合或全部组合来构建矩阵，此外还将分辨能力达到最高的两两组合的叶绿体 DNA 片段与单个核基因片段或与分辨率达到最高的核基因组合片段（*4CL*+*GI*）联合构建矩阵来评估联合的 DNA 条形码对于云杉属物种的鉴别能力。利用 MEGA 4.0（Kumar 等，2008）软件进行 Kimura-2-parameter 遗传距离分析，同时构建单独片段以及片段组合的邻接（NJ）树。另外，利用 PWG 距离法（PWG-Distance）和构建 NJ 系统聚类树（Tree-Building）两种不同的方法对物种的鉴定率进行评估。生命条形码联盟植物工作组（CBOL Plant Working Group）推荐使用的 PWG 距离法认为，种间最小的遗传距离大于种内最大的遗传距离则认为物种鉴定成功。而利用构建系统聚类树的方法时，只有同一个物种的不同个体在构建的 NJ 系统树上形成单系分支才认为物种鉴定成功。

2　结果

2.1　序列信息

本研究中所采用的 5 个叶绿体 DNA 片段和 3 个核 DNA 片段的长度和变异位点信息见表 3。所有片段的测序成功率均为 100%，共得到 415 条叶绿体 DNA 序列和 249 条核 DNA 序列。比对

表 3　用于“条形码分类”的八个片段的长度，测序成功率和变异位点信息

Table 3　Length, sequencing success and variation of each DNA region and the combination of the five plastid regions

片段 Region	比对长度 Aligned length/bp	测序成功率 Sequencing success/%	SNPs 位点数 No. of SNPs	插入缺失数 No. of indels	变异位点 No. of variable sites/%
*mat*K	945	100	13	0	13（1.38）
*rbc*L	676	100	6	0	6（0.888）
*trn*H-*psb*A	604	100	11	0	11（1.82）
*trn*L-*trn*F	709	100	7	2	9（1.27）
*trn*S-*trn*G	626	100	8	3	11（1.76）
4CL	600	100	32	0	32（5.33）
Sb29	428	100	25	2	27（6.31）
GI	679	100	23	1	24（3.53）
Five plastid regions	3 560	—	45	5	50（1.40）

后的5个叶绿体DNA片段的矩阵长度从604 bp（*trn*H-*psb*A）到945 bp（*mat*K）不等，联合后的总长度为3 560 bp，总计包含45个SNPs位点和5个indels（其中2个indels来自于*trn*L-*trn*F片段，3个indels来自*trn*S-*trn*G片段），变异位点的比例为1.40%。比对后的3个核DNA片段的矩阵长度从428（*Sb29*）到679（*GI*）不等，但变异位点的数目明显多于叶绿体DNA片段。其中4*CL*片段的变异位点数最多（32个），占该片段长度的5.33%；其次为*Sb29*片段（27个），但占其片段长度的比例为最高（6.31%）；*GI*片段的变异位点数最少（24个），占其片段长度的3.53%。

2.2　物种分辨率

本研究采用PWG-distance和Tree-Building两种方法，比较了每个片段及其相互组合对云杉属19个物种的鉴别率（图1）。PWG-distance分析结果显示，单个叶绿体DNA片段中*trn*S-*trn*G的物种分辨率最高（26.3%），能区分19个物种中的5个；其次是*mat*K，可以区分4个种（21.1%）；其余3个片段（*rbc*L，*trn*H-*psb*A和*trn*L-*trn*F）的鉴定能力很低，只能区分2个种（10.5%）。单个核DNA片段中*4CL*的物种分辨率最高（26.3%），明显高于*Sb29*和*GI*的分辨率（均为15.8%）。叶绿体DNA两片段组合的物种分辨能力明显高于单个DNA片段的分辨能力。其中，*trn*H-*psb*A+*trn*S-*trn*G和*trn*S-*trn*G+*trn*L-*trn*F组合的物种分辨能力最好，能区分19个物种中的8个（42.1%），与所有5个片段一起组合的鉴定能力相当；而生命条形码联盟植物工作组推荐的*mat*K+*rbc*L组合只有26.3%的鉴定能力；*rbc*L+*trn*L-*trn*F和*trn*H-*psb*A+*trn*L-*trn*F这两个组合的鉴定能力很低，只能区分3个物种（15.8%）。所有3个和4个叶绿体DNA组合片段的分辨能力在21.1%~42.1%之间，最高的分辨率也没有超过两个片段组合的分辨率（图1中未展示有关结果）。不同组合的核DNA片段的分辨率在26.3%（*GI*+*Sb29*）~36.8%（*4CL*+*GI*）之间，分辨能力稍好于单个片段。进一步的分析显示，叶绿体DNA片段和核基因片段联合构建的组合片段对云杉属物种的鉴别能力

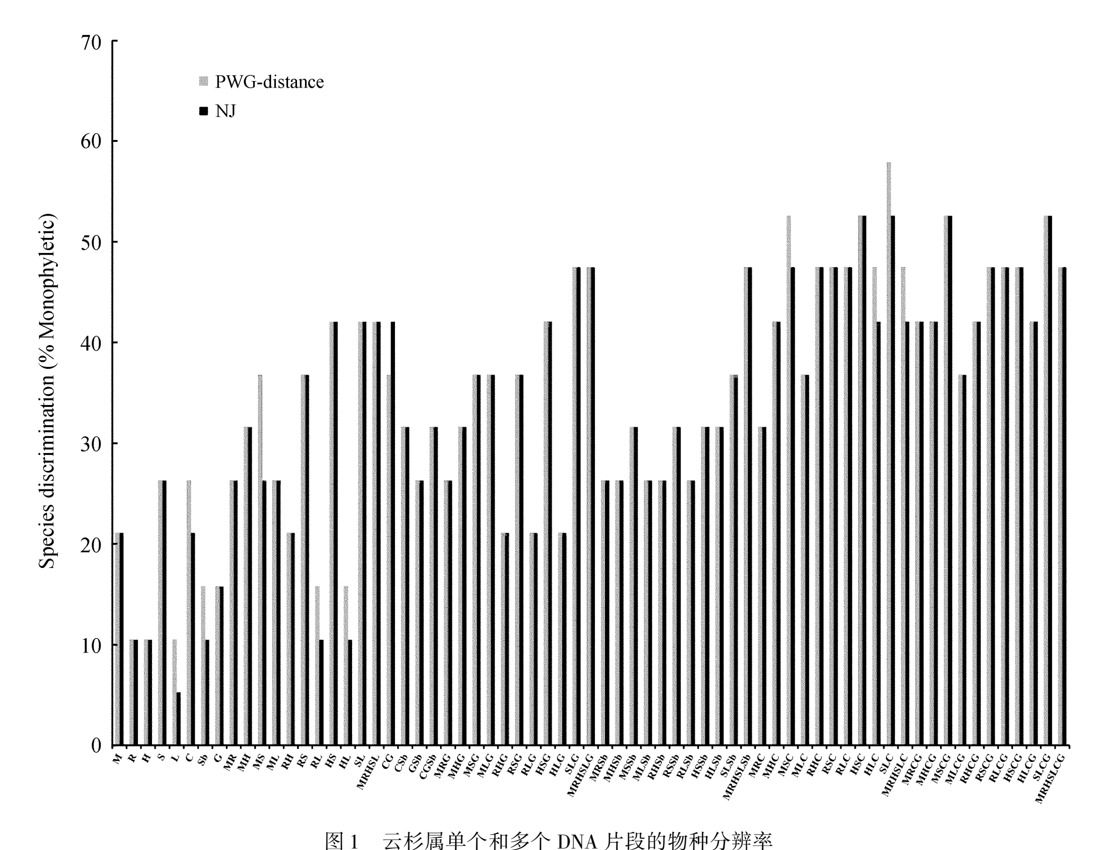


图1　云杉属单个和多个DNA片段的物种分辨率

Fig. 1　Species discrimination rate of all tested single- and multi- DNA regions in *Picea*

M, *mat*K; R, *rbc*L; H, *trn*H-*psb*A; S, *trn*S-*trn*G; L, *trn*L-*trn*F; C, 4*CL*; Sb, *Sb*29; G, *GI*; NJ, neighbor joining

较好，分辨率在 26.3% ~57.9% 之间，多数联合片段物种分辨率超过31.6%；其中和核基因 *4CL* 片段构建的联合片段分辨能力最好（所有与之联合的片段组合都超过42.1%），特别是 *trn*S-*trn*G+*trn*L-*trn*F+*4Cl* 的组合片段能够鉴定 19 个物种中的 11 个物种，分辨率可达到57.9%。

3 讨论

3.1 叶绿体 DNA 片段及单个核 DNA 片段对云杉属物种的分辨率较低

研究结果显示单个的叶绿体 DNA 片段（10.5% ~26.3%）对云杉属物种的分辨率较低。组合的叶绿体 DNA 片段的分辨能力（15.8% ~42.1%）虽然高于单个 DNA 片段，但两两组合的 DNA 片段中分辨率最高的 *trn*H-*psb*A+*trn*S-*trn*G 和 *trn*S-*trn*G+*trn*L-*trn*F 两个组合也只能成功鉴定 19 个种中的 8 个种。由于使用叶绿体基因鉴定植物类群存在上限（Lahaye 等，2008；Fazekes 等，2009），在两两组合的基础上增加片段组合（如3 个或4 个叶绿体 DNA 片段组合）都不能进一步提高物种分辨率。尽管在裸子植物中，双亲遗传的核基因相比单亲遗传的叶绿体基因有更快的突变速率，能提供更加丰富的遗传信息，但本研究结果显示无论是单个的核 DNA 片段（15.8% ~26.3%）还是不同核 DNA 片段的组合（26.3% ~36.8%）对该属的物种鉴定效率都很低。DNA 条形码对云杉属物种较低的鉴定率可能是由多个因素造成的。首先，云杉属内近缘物种之间频繁的杂交渐渗（Li 等，2010；Du 等，2011；Zou 等，2012），种间存在大量共享基因型，导致单个或少量 DNA 条形码片段难以分辨。例如，*P. purpurea* 被推测可能是 *P. likiangesis* 和 *P. wilsonii* 的杂交物种，由于反复回交导致 *P. purpurea* 和 *P. wilsonii* 共享大量细胞质基因型（Li 等，2010），使两物种之间的 DNA 变异界限模糊难以分辨（图 2）。其次，由于云杉属内物种近期的辐射分化（Ran 等，2006），导致种间形态趋同且短时间内没有积累足够的遗传变异，物种分辨困难。例如分布于青藏高原及其周边地区的 *P. likiangesis*，其所包含的 3 个变种可能是由于近期分化而形成的，种间遗传差异小，在进化树上难以形成单系（图 2，3）。此外，传统的形态学分类存在缺陷，对云杉属内物种的划分不尽合理，影响物种鉴定的成功率。按照 Farjón（2001）对云杉属物种的分类，将云杉复合体（*P. asperata* complex，Du 等，2009）划分为 5 个种（*P. asperata*，*P. crassifolia*，*P. koraiensis*，*P. meyeri*，*P. obovata*），而本研究的结果显示除核基因 *4CL* 片段能成功鉴定 *P. obovata* 外，其余 4 个种都不能被成功分辨，物种划分可能有不合理之处；或这些物种是近期分化而成，尚未积累足够的遗传分化。另外，由于裸子植物有较长的世代时间，不完全的谱系筛选导致保留大量祖先多态性和低水平的种间分化（Syring 等，2007；Willyard 等，2009；Chen 等，2010），阻碍了对云杉属物种的鉴定。综上原因，使用叶绿体 DNA 片段及单个核 DNA 片段对云杉属植物进行鉴定存在困难。

3.2 叶绿体 DNA 片段和核 DNA 的片段组合对云杉属物种具有较好的分辨能力

本研究利用核基因 *4CL* 片段对云杉属物种的分辨率分析发现，尽管总体的鉴定能力较低，但该片段能够成功鉴定叶绿体 DNA 片段不能分辨的杂交物种 *P. purpurea*（图 3）。一些研究发现在缺少核 DNA 条形码的情况下可能会错误地鉴定某些具有大量物种的植物类群（Chase 等，2005，2007；Chase 和 Fay，2009；Ford 等，2009；Li 等，2011），因此利用核 DNA 片段作为补充的 DNA 条形码应该成为一种趋势。对于云杉属这种只靠单个或数个叶绿体 DNA 条形码片段很难鉴定的植物类群，Ran 等（2010）建议可用核 DNA 片段作为合并的 DNA 条形码来提高对该属物种的鉴定水平。本研究发现，利用两两联合的叶绿体 DNA 片段和核基因片段联合构建的组合片段对云杉属物种的分辨能力显著提高，其中和核基因 *4CL* 片段构建的联合片段分辨能力最好，特别是 *trn*S-*trn*G+*trn*L-*trn*F+4*CL* 的组合片段，其分辨率能达到 57.9%。由此可以看出，结合不同来源的基因组片段可提高对云杉属物种的鉴定能力。因此，本研究表明：在将来利用 DNA 变异鉴别植物物种的研究分析中，在常规 DNA 条形码片段不起作用的情况下，可采用这种结合常规 DNA 条形码片段和核基因 DNA 片段的方法来鉴别一些属内的植物物种。

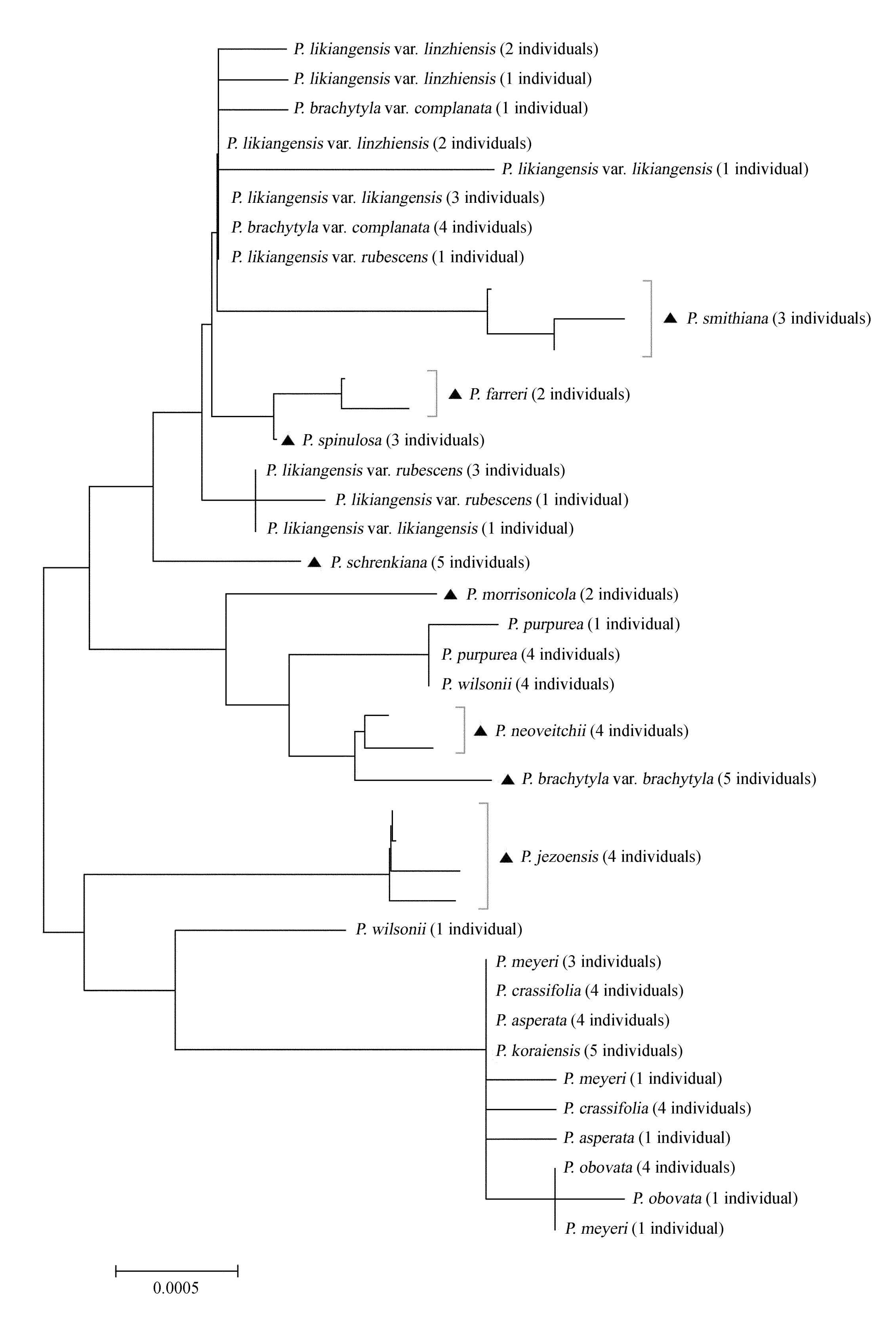


图2 基于5个叶绿体DNA片段联合构建的NJ树。三角形代表利用Tree-building方法被成功鉴定的物种

Fig. 2 A NJ tree based on the combination of all five chloroplast DNA regions. Species with solid triangles were successfully delimited using the Tree-building method

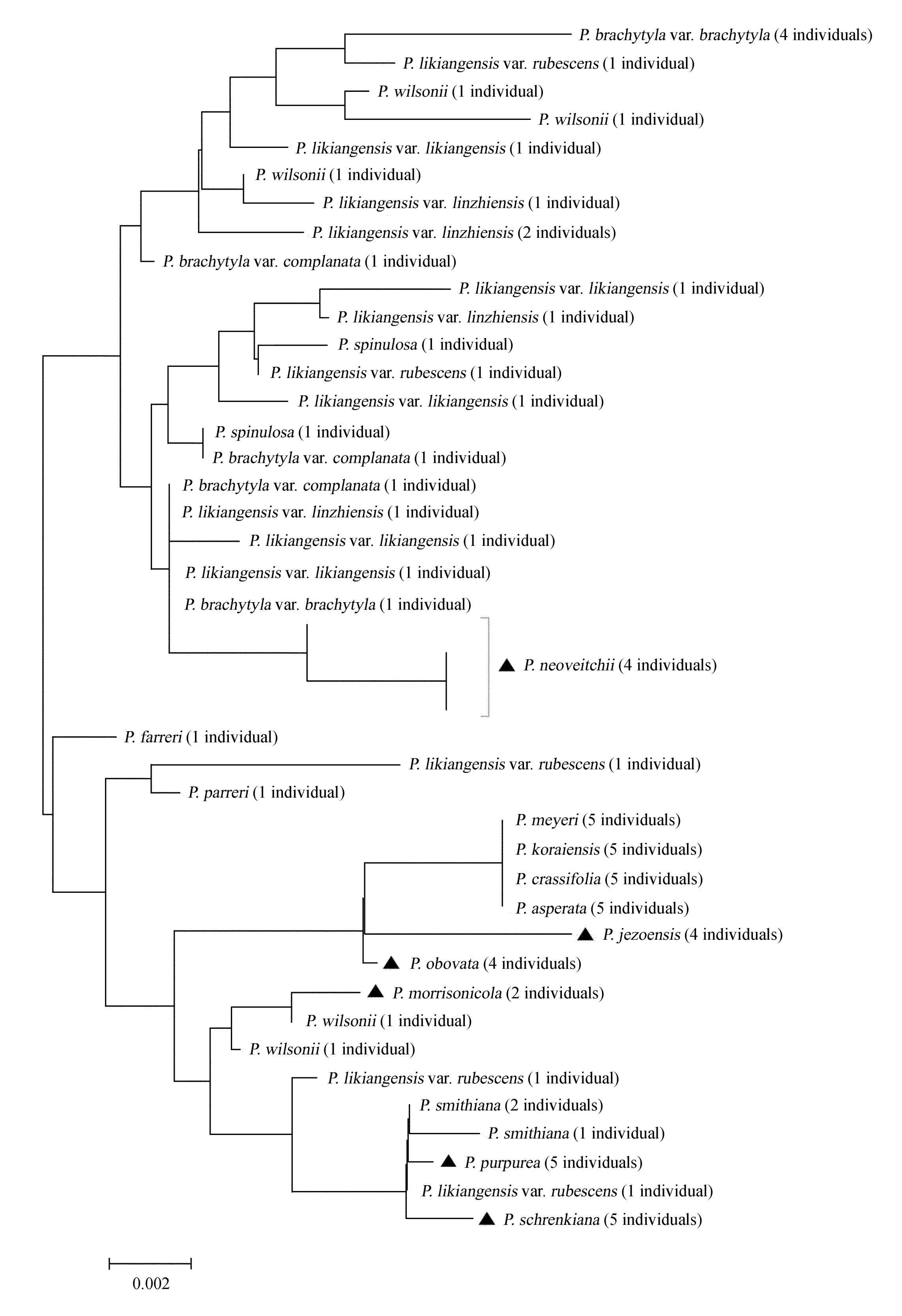


图 3　基于核基因 *4CL* 构建的 NJ 树。三角形代表利用 Tree-building 方法被成功鉴定的物种

Fig. 3　A NJ tree based on the nuclear *4CL* gene. Species with solid triangles were successfully delimited using the Tree-building method

〔参 考 文 献〕

CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (31): 12794—12797

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M *et al.*, 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360** (1462): 1889—1895

Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM *et al.*, 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, **56** (2): 295—299

Chase MW, Fay MF, 2009. Barcoding of plants and fungi [J]. *Science*, **325**: 682—683

Cho Y, Mower JP, Qiu YL *et al.*, 2004. Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101** (51): 17741—17746

Chen J, Källman T, Gyllenstrand N *et al.*, 2010. New insights on the speciation history and nucleotide diversity of three boreal spruce species and a Tertiary relict [J]. *Heredity*, **104** (1): 3—14

Cowan RS, Chase MW, Kress WJ *et al.*, 2006. 300, 000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants [J]. *Taxon*, **55** (3): 611—616

Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11—15

Du FK, Peng XL, Liu JQ *et al.*, 2011. Direction and extent of organelle DNA introgression between two spruce species in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *New Phytologist*, **192**: 1024—1033

Farjón A, 2001. *World Checklist and Bibliography of Conifers* [M]. Kew: Royal Botanic Gardens, UK

Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR *et al.*, 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. *PLoS ONE*, **3** (7): e2802

Fazekes AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS *et al.*, 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers?[J]. *Molecular Ecology Resources*, **9** (Supp1. 1): 130—139

Ford CS, Ayres KL, Toomey N *et al.*, 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **159** (1): 1—11

Fu L, Li N, Mill RR, 1999. *Picea* [A]. In: Wu ZY, Raven PH (eds.), *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press; S t. Louis: Missouri Botanical Garden Press, **1** (4): 25—32

Hamilton M, 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation [J]. *Molecular Ecology*, **8** (3): 512—523

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al.*, 2003. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**: 313—321

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS *et al.*, 2004. Identification of birds through DNA Barcodes [J]. *PLoS Biology*, **2** (10): e312

Heuertz M, Paoli ED, Källman T *et al.*, 2006. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst] [J]. *Genetics*, **174** (4): 2095—2105

Hollingsworth PM, 2011. Refining the DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (49): 19451—19452

Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP, 2011. Choosing and using a plant DNA barcode [J]. *PLoS ONE*, **6**: e19254

Ivanova NV, Fazekas AJ, Hebert PDN, 2008. Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plants [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, **26** (3): 186—198

Kan XZ, Wang SS, Ding X *et al.*, 2007. Structural evolution of nrDNA ITS in Pinaceae and its phylogenetic implications [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44** (2): 765—777

Kerr KC, Stoeckle MY, Dove CJ *et al.*, 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds [J]. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 535—543

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA *et al.*, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102** (23): 8369—8374

Kumar S, Nei M, Dudley J *et al.*, 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequence [J]. *Brief Bioinform*, **9** (4): 299—306

Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D *et al.*, 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105** (8): 2923—2928

Li Y, Stocks M, Hemmilä S *et al.*, 2010. Demographic histories of four spruce (*Picea*) species of the Qinghai-Tibetan Plateau and neighboring areas inferred from multiple nuclear loci [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **27** (5): 1001—1014

Li DZ, Gao LM, Li HT *et al.*, 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (49): 19641—19646

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, **25** (11): 1451—1452

Palmer JD, Herbon LA, 1988. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence [J]. *Journal of Molecular Evolution*, **28**: 87—97

Pennisi E, 2007. Taxonomy. Wanted: a barcode for plants [J]. *Science*, **318**: 190—191

Perry DJ, Bousquet J, 1998. Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: development, characterization and analysis of linkage in black spruce [J]. *Genetics*, **149** (2): 1089—1098

Ran JH, Wang PP, Zhao HJ *et al.*, 2010. A test of seven candidate barcode regions from the plastome in *Picea* (Pinaceae) [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52** (12): 1109—1126

Ran JH, Wei XX, Wang XQ *et al.*, 2006. Molecular phylogeny and biogeography of *Picea* (Pinaceae): Implication for phylogeographical studies using cytoplasmic haplotypes [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**: 405—419

Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF, 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *American Journal of Botany*, **84** (8): 1120—1136

Smith MA, Poyarkov NA, Hebert PDN, 2008. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge [J]. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 235—246

Syring J, Farrell K, Businsky R *et al.*, 2007. Widespread genealogical nonmonophyly in species of *Pinus* subgenus strobes [J]. *Systematic Biology*, **56** (2): 163—181

Syring J, Willyard A, Cronn R *et al.*, 2005. Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci [J]. *American Journal of Botany*, **92** (12): 2086—2100

Taberlet P, Gielly L, Pautou G *et al.*, 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. *Plant Molecular Biology*, **17** (5): 1105—1109

Tate JA, Simpson BB, 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species [J]. *Systematic Botany*, **28** (4): 723—737

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.*, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic acids research*, **25** (24): 4876—4882

Vences M, Thomas M, Bonett RM *et al.*, 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**: 1859—1868

Ward RD, Hanner R, Hebert PDN, 2009. The campaign to DNA barcode all fishes [J]. *Journal of Fish Biology*, **74** (2): 329—356

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH *et al.*, 2005. DNA barcoding Australia's fish species [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**: 1847—1857

Willyard A, Cronn R, Liston A, 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**: 498—511

Zou JB, Peng XL, Li L *et al.*, 2012. Molecular phylogeography and evolutionary history of *Picea likiangensis* in the Qinghai-Tibetan Plateau inferred from mitochondrial and chloroplast DNA sequence variation [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **50** (4): 341—350